

PCT/FR 95 / 0 1 2 3 9

08/8051650

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

PRIORITY DOCUMENT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 OCT. 1995

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef de Division

Yves CAMPENON

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : (1) 42 94 52 52
Télécopie : (1) 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)



REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature N et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFERÉ
OU RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☒ NONSI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE, IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE☐ OUI☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

26.09.94.

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

94 11460 -

DATE DE DÉPÔT

26 SEP 1994

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

B2622 - EG

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

44 51 18 00

7 TITRE DE L'INVENTION

COMPOSITIONS DE MURAMYL PEPTIDES CAPABLES D'INHIBER ^{JUSQU'} 100% LA
REPLICATION D'UN VIRUS DE L'IMMUNO-DÉFICIENCE ACQUISE, TEL QUE
LE VIH

8 DEMANDEUR(S) Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

N° SIREN

VACSYN S.A.
société anonyme

9 ADRESSE(S) COMPLETE(S)

Les Chevrions
33, Bd. du Général Martial Valin
75015 PARIS (FRANCE)

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANÇAISE

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSEES

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVOCACTION DE PRIORITE

DE REVOCACTION (à partir de la 1^{re})

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR☐ OUI

SI L'INVENTION EST UN BREVET D'INVENTION

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE, NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT QU'IL AIE REÇU LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES☐ OUI☐ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

DU BREVET DE BÉNÉFICIAIRE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES À LA
PRÉSENTE DEMANDE

N

N

N

N

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE N° D'INSCRIPTION

ERNEST GUTMANN-YVES
PLASSERAUD S.A.
GUTMANN Ernest n°92-1106

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

94 11460

Titre de l'invention :

**COMPOSITIONS DE MURAMYLPEPTIDES CAPABLES D'INHIBER
JUSQU'A 100% LA REPLICATION D'UN VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
ACQUISE, TEL QUE LE VIH.**

Le (s) soussigné (s)

**ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.
3 rue Chauveau-Lagarde
75008 PARIS (France).**

**désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom
patronymique) :**

**BAHR Georges
Minerve 1
14 rue Paul Lafargue
92800 PUTEAUX (France)**

**NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient
(société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.**

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 28 décembre 1994

Florence LAZARD - N° 92 -4029

**ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.**

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
4, 5, 7, 9, 10				3 NOV 1994	

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

COMPOSITIONS DE MURAMYLPEPTIDES CAPABLES D'INHIBER
JUSQU'A 100 % LA REPLICATION D'UN VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE, TEL QUE LE VIH

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie dévastatrice causée par une infection par le rétrovirus VIH. Beaucoup d'efforts ont été consacrés à trouver des médicaments capables d'inhiber la réplication du virus. Mais peu de succès significatifs ont été obtenus jusqu'à ce jour. Bien que le VIH puisse infecter beaucoup de cellules différentes, la maladie est majoritairement causée par la destruction et/ou le dysfonctionnement d'une sous-population de lymphocytes appelés cellules T auxiliaires. On attribue depuis peu la persistance de l'infection par le virus à sa capacité à infecter une autre population importante de cellules, la lignée monocyte/macrophage, qui servirait de réservoir pour un relargage continu du virus. Le rôle important joué par cette lignée par VIH dans la persistance et la progression de la maladie a été expliquée par 1) l'isolement de variants monocytootropes du VIH des leucocytes du sang circulant et des macrophages tissulaires des sujets infectés à tous les stades de l'infection (J. Virology, ; Vol. 65, pages 356-363, 1991) et 2) la corrélation directe entre une absence de dysfonctionnement de l'immunité systémique chez l'hôte infecté et une absence de réplication virale dans la lignée monocyte/macrophage (J. infectious diseases, Vol. 168, pages 1140-1147, 1993). De plus, l'inhibition d'une infection produisant du virus dans les monocytes semble être liée dans une grande mesure à l'inhibition de la prolifération monocyttaire, suggérant que la réplication du virus dépend d'une étape préalable obligatoire de prolifération de la

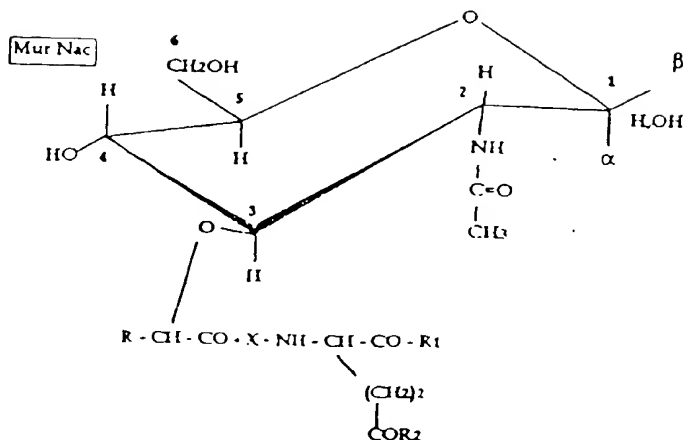
cellule monocytaire haute. Ainsi, la prolifération de cette population serait-elle un passage obligé pour la manifestation du caractère infectieux du VIH. Ainsi l'hypothèse a-t-elle été formulée que des substances capables d'inhiber la réplication monocytaire pourraient aussi inhiber la réplication de VIH (J. Clinical Investigation, Vol. 89, pages 1154-1160, 1992).

Les muramylpeptides sont des copies synthétiques de la paroi bactérienne et ont été trouvés capables de très nombreuses activités immunopharmacologiques sur la lignée monocyte/macrophage (Federation proceedings, Vol. 45, pages 2541-2544, 1986). De plus, la molécule initiale, la N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D- Isoglutamine (Nac-Mur-L-Ala-DisoGln) encore appelée Muramyl dipeptide ou MDP, a été décrite capable d'inhiber la prolifération des macrophages de cobayes (Cellular Immunology, Vol. 89, pages 427-438, 1984). Dans une autre étude utilisant des lignées cellulaires établies de lymphocytes ou de cellules de type monocytaires, le MDP a été trouvé doué de la capacité d'inhiber partiellement la réplication de HIV, lorsqu'il est utilisé in vitro à des doses très élevées 1000 µg/ml (AIDS Research and Human Retroviruses, Vol. 6, pages 393/394, 1990). Cependant outre que l'utilisation du MDP en clinique humaine est difficilement envisageable à cause des effets secondaires qu'il induit, les effets observés, même à ces doses élevées dans le système expérimental utilisé, ne préjugeraient d'aucune efficacité thérapeutique vis-à-vis de l'infection par le VIH. Lazdins et al (AIDS Research and Human Retroviruses, Vol. 6, pages 1157-1161, 1990), ont montré in vitro des propriétés similaires d'inhibition de la réplication du VIH pour un muramylpeptide ayant un meilleur index thérapeutique

que le MDP : le MTP-PE. Cette molécule sous forme libre a été ajoutée de façon répétitive avant et après l'infection par VIH à des cultures de macrophages issus de monocytes humains mis en culture. Mais elle n'a pu, dans ces conditions, induire qu'une réduction partielle de la réplication virale. Il faut souligner que, le MTP-PE n'a été capable, ni à l'état libre, ni incorporé dans des liposomes, de provoquer une suppression totale de la réplication virale. En outre son activité ne peut s'exercer que si ce composé est présent le jour de l'infection de la culture cellulaire par le virus. Si le composé est ajouté un jour avant ou 4 jours après la culture, son activité est minimum.

Ces résultats ne rendent que plus étonnants ceux qui ont été obtenus avec une catégorie de muramylpeptides hydrophiles, homologues, qui se sont avérés permettre une inhibition complète de la prolifération de VIH, notamment dans des cultures primaires de monocytes, et ce à des doses beaucoup plus faibles. Leur toxicité moindre s'ajoutant à ces effets favorables, les rend donc aptes à la constitution de médicaments aptes à prévenir ou traiter des SIDA et/ou des syndromes qui s'y rapportent.

L'invention est plus particulièrement relative à l'utilisation pour la constitution de médicaments inhibant la réplication de rétrovirus de l'immunodéficience acquise chez l'homme ou ceux de mammifères qu'ils sont susceptibles d'infecter, d'un muramylpeptide de formule :



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est un résidu L-alanyle ou L-thréonyle, et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $O(CH_2)_xH$ avec $x = 1, 2, 3$ ou 4 , étant entendu que, lorsque x est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH_2)_xH$ tel que précédemment défini.

Des composés préférés pour l'utilisation selon l'invention sont le Murabutide (Nac-Mur-L-Ala-DGln $O_nC_4H_9$) et le Muramétide (Nac-Mur-L-Ala-DGln OMe). Ces molécules présentent un excellent profil d'activités chez l'homme ; elles sont dénuées d'effets secondaires et ont démontré leur très bonne tolérance, lors d'essais cliniques effectués chez des volontaires sains et des sujets cancéreux.

Il est à cet égard remarquable que les susdits muramylpeptides soient capables, à des concentrations relativement faibles, d'exercer une inhibition complète, jusqu'à 100 %, de la prolifération du VIH, dans des cultures primaires de monocytes, et ce plus

particulièrement dans les protocoles expérimentaux auxquels il sera fait référence ci-après.

Il est particulièrement intéressant de remarquer que la manifestation de l'effet inhibiteur de ces muramylpeptides à l'égard de la répllication virale, n'est pas liée à une simultanéité d'infection des monocytes et de traitement de ces dernières avec ces muramylpeptides.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit, des effets biologiques exercés par deux muramylpeptides préférés à l'encontre de la répllication du VIH dans des cultures primaires de monocytes humains prélevés sur des volontaires sains.

Dans l'exemple 1, le Murabutide et le Muramétide ont démontré leur capacité d'inhiber la prolifération de macrophages en culture. Pour cela, des monocytes prélevés chez un donneur sont mis en culture pendant 5 jours soit a) sans stimulation (afin d'évaluer leur niveau de prolifération spontanée) soit b) en présence d'interleukine 3 recombinante humaine (rh IL-3) soit c) en présence et de rh IL-3 et de rh GM-CSF "granulocyte-macrophage colony stimulating factor" recombinant humain. Ces deux traitements permettent d'obtenir un haut niveau de prolifération. Les composés de l'invention sont ajoutés au milieu de culture un jour avant l'addition de thymidine tritiée (^3H -thymidine). Les cellules en voie de division incorporent cette thymidine. Les cellules (qui se sont différenciées en macrophages pendant la durée de la culture) sont recueillies et lavées, et on évalue le niveau de prolifération en mesurant dans un compteur beta, la quantité de ^3H incorporée suivant des méthodes classiques telles que décrites dans Blood,

Vol. 76, pages 1490-1493, 1990. Les résultats sont présentés dans le tableau 1 et montrent que les deux dérivés sont capables, même à la dose de 1 $\mu\text{g/ml}$, d'inhiber la prolifération des macrophages stimulées par l'IL-3 ou la combinaison IL-3/GM-CSF. L'effet d'inhibition de la prolifération spontanée a été observé avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de Murabutide et 10 ou 50 $\mu\text{g/ml}$ de Muramétide.

L'exemple 2 démontre l'effet du Murabutide et du Muramétide sur le niveau de répllication du VIH dans des cultures primaires de monocytes humains prélevés sur des volontaires sains. Des cultures monocytaires ont été infectées au jour 0 par une source VIH (HTLV III Ba-L) qui présente un tropisme pour les monocytes. Certaines cultures furent traitées par différentes concentrations des composés soit 1 jour avant, soit le même jour, soit 1 jour après l'inoculation par le VIH. La répllication du virus a été évaluée au jour 7 par la mesure de la quantité de protéine virale P24 dans les surnageants comme décrite dans Blood, Vol.76, page 1490-1493, 1990. Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent clairement que le traitement par le Murabutide à une concentration de 10 à 50 $\mu\text{g/ml}$ inhibe complètement la répllication virale que le traitement ait été pratiqué au jour -1, au jour 0 ou au jour +1 par rapport à l'infection. De façon similaire, le traitement par le Muramétide a permis d'observer une suppression hautement significative de la répllication virale et cet effet est de 100 % à la dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ quelque soit ici aussi le montant du traitement.

Ces résultats sont les premiers décrits ayant permis d'obtenir une inhibition complète par un muramylpeptide de la répllication de VIH dans des

monocytes humains. Il faut souligner que l'inhibition s'obtient quand le composé est ajouté à la culture une seule fois et même après l'infection par VIH.

Les données précédentes montrent que les muramylpeptides de l'invention peuvent être appliquées à la constitution de médicaments applicables à la prévention ou le traitement du SIDA, ou des syndromes qui lui sont associés, par exemple le sarcome de Kaposi.

L'invention est également applicable à la constitution de médicaments dans lesquels les muramylpeptides sont utilisés en association avec d'autres agents thérapeutiques utilisés pour prévenir ou inhiber la prolifération et la diffusion du VIH chez l'homme. Parmi ces agents on peut citer les interférons α , β , γ et le GM-CSF.

Les molécules de l'invention peuvent être utilisées en clinique humaine soit à titre préventif chez des sujets à risques, soit à titre curatif chez des individus séropositifs avant l'apparition de signes cliniques ou des patients ayant développé des manifestations de SIDA. Les doses thérapeutiques du muramylpeptide (par exemple Murabutide ou Muramétide) à administrer soit seul, soit en association avec des traitements antiviraux, particulièrement des cytokines, se situent entre 1 μ g et 500 μ g/Kg/jour. L'administration peut être donnée par voie systémique, par injection sous-cutanée ou intraveineuse ou par perfusion. Le traitement peut consister en administrations journalières ou à quelques jours d'intervalle et se prolonger de une semaine à plusieurs mois suivant l'effet observé.

Dans le cas d'individus séropositifs ou malades, le traitement doit être prolongé jusqu'à absence de détection d'antigène ou de gènes viraux respectivement dans le sérum ou les cellules de l'individu infecté. Dans le cas d'individus à risque, le traitement préventif doit être appliqué pendant la période où il existe un risque d'infection.

Les molécules de l'invention ainsi que les autres molécules de la famille des muramylpeptides peuvent aussi être utilisées comme réactifs de laboratoire afin de permettre l'évaluation en tant qu'agents anti-VIH d'autres drogues présumées douées d'activité antivirale. Ainsi des doses suboptimales de muramylpeptides pourraient être utilisées en association avec un autre agent pour déceler une activité potentielle de ce dernier.

Ce type de réactif pourrait être utilisé dans des systèmes d'expérimentation in vitro mettant en oeuvre des cultures de monocytes/macrophages telles que décrites dans ce brevet ou des méthodes d'évaluation in vivo incluant l'utilisation de souris SCID.

TABLE 1

*Inhibition de la prolifération de cultures primaires de macrophages
par le Murabutide ou le Muramétide*

Molécules testées ($\mu\text{g/ml}$)	Prolifération des macrophages après stimulation					
	Milieu		rh IL-3		rh IL-3 + rh GM-CSF	
	Cpm*	% inhibition	Cpm	% inhibition	Cpm	% inhibition
-	1500	0	3400	0	5000	0
Murabutide						
(1)	1400	7	2600	23	2100	58
(10)	100	93	600	82	1000	80
(50)	900	40	1700	50	1200	76
(100)	1500	0	2100	38	2000	60
Muramétide						
(1)	300	80	1000	70	1100	78
(10)	1200	20	1700	50	1300	74
(50)	150	90	500	85	1000	80
(100)	1000	33	1600	53	1350	73

* : coups par minute de ^3H -thymidine/culture

TABLE 2

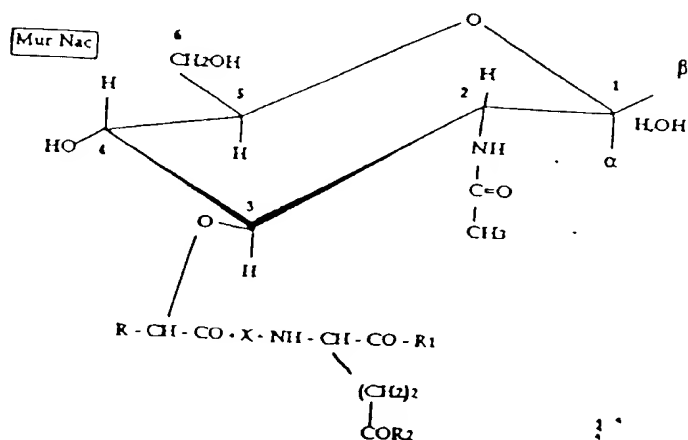
*Inhibition de la réplication du VIH dans des monocytes humains suivant un
par le Murabutide ou le Muramétide*

Molécule s testées ($\mu\text{g/ml}$)	Réplication du HIV dans des cultures de 7 jours de monocytes humains traitées au					
	JOUR -1*		JOUR 0		JOUR +1	
	P24 (ng/ml)	% inhibition	P24 (ng/ml)	% inhibition	P24 (ng/ml)	% inhibition
Murabutide						
(0)	755	0	755	0	755	0
(1)	355	53	480	36	105	86
(10)	0	100	0	100	0	100
(50)	0	100	0	100	0	100
(100)	70	91	0	100	0	100
Muramétide						
(0)	874	0	874	0	874	0
(1)	473	46	255	71	182	79
(10)	136	84	182	79	27	97
(50)	0	100	0	100	0	100
(100)	36	96	55	94	0	100

* : le jour du traitement indique le jour où les molécules ont été ajoutées au milieu de culture par rapport au jour de l'infection par le VIH qui est considéré comme jour 0.

REVENDICATIONS

1. Utilisation pour la constitution de médicaments inhibant la réplication de rétrovirus de l'immunodéficience acquise chez l'homme ou ceux de mammifères qu'ils sont susceptibles d'infecter, d'un muramylpeptide de formule



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est un résidu L-alanyle, ou L-thréonyle et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $\text{O}(\text{CH}_2)_x\text{H}$ avec $x = 1, 2, 3$ ou 4, étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $\text{O}(\text{CH}_2)_x\text{H}$ tel que précédemment défini.

2. Utilisation selon la revendication 1, à la constitution de médicaments inhibant la réplication d'un VIH chez l'homme.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le muramylpeptide est apte à inhiber jusqu'à 100 % la

réplication de rétrovirus dans des cultures primaires de monocytes de l'hôte.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le muramylpeptide est l'un de ceux entrant dans la formule de la revendication 1, dans laquelle

- . le groupe R est un groupe méthyle, et
- . le groupe R2 est un groupe NH_2

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le muramylpeptide est le Muramétide.

6. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le muramylpeptide est le Murabutide.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, en tant que réactif, pour l'évaluation de l'efficacité de médicaments anti-rétroviraux, dans des essais in vitro ou in vivo.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour la prévention ou le traitement du SIDA ou des syndromes qui lui sont associés, notamment le sarcome de Kaposi.

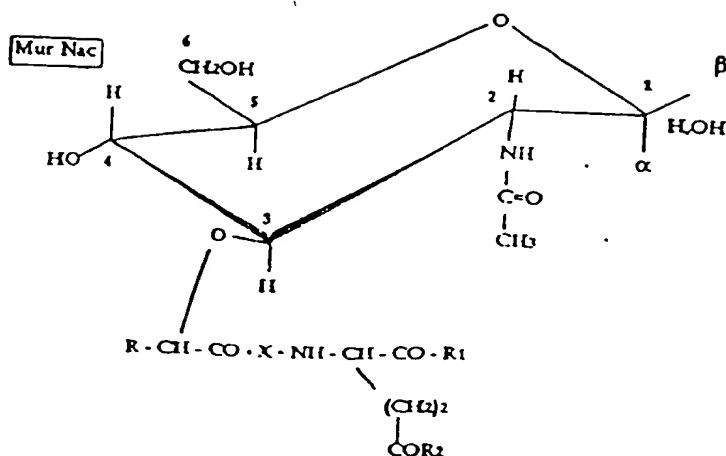
9. Utilisation selon la revendication 8, pour la constitution de médicaments contenant en sus du susdit muramylpeptide, une autre molécule participant à l'action anti-rétrovirale.

10. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'autre molécule est un médicament, telle que la 3'-azido-2'-3'- desoxy-thymidine (AZT).

11. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'autre molécule est une cytokine, tel qu'un interféron a, b ou g.

12. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'autre molécule est le GM-CSF.

13. Utilisation selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'autre molécule est un inhibiteur de protéase.



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est un résidu L-alanyle ou L-thréonyle, et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $O(CH_2)_x H$ avec $x = 1, 2, 3$ ou 4 , étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH_2)_x H$ tel que précédemment défini.

Des composés préférés pour l'utilisation selon l'invention sont le Murabutide (Nac-Mur-L-Ala-DGln $O_nC_4H_9$) et le Muramétide (Nac-Mur-L-Ala-DGln OMe). Ces molécules présentent un excellent profil d'activités chez l'homme ; elles sont dénuées d'effets secondaires et ont démontré leur très bonne tolérance, lors d'essais cliniques effectués chez des volontaires sains et des sujets cancéreux.

Il est à cet égard remarquable que les susdits muramylpeptides soient capables, à des concentrations relativement faibles, d'exercer une inhibition complète, jusqu'à 100 %, de la prolifération du VIH, dans des cultures primaires de monocytes, et ce plus

particulièrement dans les protocoles expérimentaux auxquels il sera fait référence ci-après.

Il est particulièrement intéressant de remarquer que la manifestation de l'effet inhibiteur de ces muramylpeptides à l'égard de la réplication rétrovirale, n'est pas liée à une simultanéité d'infection des monocytes et de traitement de ces dernières avec ces muramylpeptides.

Des caractéristiques supplémentaires de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit, des effets biologiques exercés par deux muramylpeptides préférés à l'encontre de la réplication du VIH dans des cultures primaires de monocytes humains prélevés sur des volontaires sains.

Dans l'exemple 1, le Murabutide et le Muramétide ont démontré leur capacité d'inhiber la prolifération de macrophages en culture. Pour cela, des monocytes prélevés chez un donneur sont mis en culture pendant 5 jours soit a) sans stimulation (afin d'évaluer leur niveau de prolifération spontanée) soit b) en présence d'interleukine 3 recombinante humaine (rh IL-3) soit c) en présence et de rh IL-3 et de rh GM-CSF "granulocyte-macrophage colony stimulating factor" recombinant humain. Ces deux traitements permettent d'obtenir un haut niveau de prolifération. Les composés de l'invention sont ajoutés au milieu de culture un jour avant l'addition de thymidine tritiée (^3H -thymidine). Les cellules en voie de division incorporent cette thymidine. Les cellules (qui se sont différenciées en macrophages pendant la durée de la culture) sont recueillies et lavées, et on évalue le niveau de prolifération en mesurant dans un compteur beta, la quantité de ^3H incorporée suivant des méthodes classiques telles que décrites dans Blood,

monocytes humains. Il faut souligner que l'inhibition s'obtient quand le composé est ajouté à la culture une seule fois et même après l'infection par VIH.

Les données précédentes montrent que les muramylpeptides de l'invention peuvent être appliquées à la constitution de médicaments applicables à la prévention ou le traitement du SIDA, ou des syndromes qui lui sont associés, par exemple le sarcome de Kaposi.

L'invention est également applicable à la constitution de médicaments dans lesquels les muramylpeptides sont utilisés en association avec d'autres agents thérapeutiques utilisés pour prévenir ou inhiber la prolifération et la diffusion du VIH chez l'homme. Parmi ces agents on peut citer les interférons α , β , γ et le GM-CSF.

Les molécules de l'invention peuvent être utilisées en clinique humaine soit à titre préventif chez des sujets à risques, soit à titre curatif chez des individus séropositifs avant l'apparition de signes cliniques ou des patients ayant développé des manifestations de SIDA. Les doses thérapeutiques du muramylpeptide (par exemple Murabutide ou Muramétide) à administrer soit seul, soit en association avec des traitements antiviraux, particulièrement des cytokines, se situent entre 1 μ g et 500 μ g/Kg/jour. L'administration peut être donnée par voie systémique, par injection sous-cutanée ou intraveineuse ou par perfusion. Le traitement peut consister en administrations journalières ou à quelques jours d'intervalle et se prolonger de une semaine à plusieurs mois suivant l'effet observé.

TABLE 1
Inhibition de la prolifération de cultures primaires de macrophages
par le Murabutide ou le Muramétide

Molécules testées ($\mu\text{g/ml}$)	Prolifération des macrophages après stimulation					
	Milieu		rh IL-3			
	Cpm*	% inhibition	Cpm	% inhibition	rh IL-3 + rh GM-CSF	
					Cpm	% inhibition
	1500	0	3400	0	5000	0
Murabutide						
(1)	1400	7	2600	23		
(10)	100	93	600	82	2100	58
(50)	900	40	1700	50	1000	80
(100)	1500	0	2100	38	1200	76
					2000	60
Muramétide						
(1)	300	80	1000	70		
(10)	1200	20	1700	50	1100	78
(50)	150	90	500	85	1300	74
(100)	1000	33	1600	53	1000	80
					1350	73

* : coups par minute de ^3H -thymidine/culture

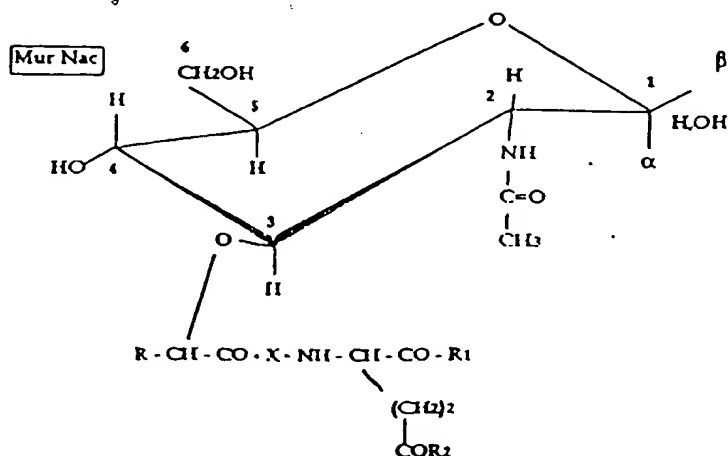
TABLE 2
Inhibition de la réplication du VIH dans des monocytes humains
par le Murabutide ou le Muramétide

Molécule s testées ($\mu\text{g/ml}$)	Réplication du HIV dans des cultures de 7 jours de monocytes humains traitées au					
	JOUR -1*		JOUR 0		JOUR +1	
	P24 (ng/ml)	% inhibition	P24 (ng/ml)	% inhibition	P24 (ng/ml)	% inhibition
Murabutide						
(0)	755	0	755	0	755	0
(1)	355	53	480	36	105	86
(10)	0	100	0	100	0	100
(50)	0	100	0	100	0	100
(100)	70	91	0	100	0	100
Muramétide						
(0)	874	0	874	0	874	0
(1)	473	46	255	71	182	79
(10)	136	84	182	79	27	97
(50)	0	100	0	100	0	100
(100)	36	96	55	94	0	100

* le jour du traitement indique le jour où les molécules ont été ajoutées au milieu de culture par rapport au jour de l'infection par le VIH qui est considéré comme jour 0

REVENDECATIONS

1. Utilisation pour la constitution de médicaments inhibant la réplication de rétrovirus de l'immunodéficience acquise chez l'homme ou ceux de mammifères qu'ils sont susceptibles d'infecter, d'un muramylpeptide de formule



dans laquelle le groupe R est un hydrogène ou un groupe méthyle ; X est un résidu L-alanyle, ou L-thréonyle et R1 et R2 sont indépendamment l'un de l'autre, des groupes hydroxyle, amino, $O(CH_2)_x H$ avec $x = 1, 2, 3$ ou 4 , étant entendu que, lorsque X est un résidu L-alanyle, l'un au moins de ces deux groupes R1 et R2 est toujours un groupe $O(CH_2)_x H$ tel que précédemment défini.

2. Utilisation selon la revendication 1, à la constitution de médicaments inhibant la réplication d'un VIH chez l'homme.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que le muramylpeptide est apte à inhiber jusqu'à 100 % la